

(19) 【発行国】日本国特許庁 (JP)	(19) [Publication Office] Japanese Patent Office (JP)
(12) 【公報種別】公開特許公報 (A)	(12) [Kind of Document] Japan Unexamined Patent Publication (A)
(11) 【公開番号】特開平 5-336979	(11) [Publication Number of Unexamined Application (A)] Japan Unexamined Patent Publication Hei 5-336979
(43) 【公開日】平成 5 年 (1993) 12 月 21 日	(43) [Publication Date of Unexamined Application] 1993 (1993) December 21 day
(54) 【発明の名称】パラヒドロキシ安息香酸の製造方法	(54) [Title of Invention] MANUFACTURING METHOD OF P-HYDROXYBENZOIC ACID
(51) 【国際特許分類第 5 版】	(51) [International Patent Classification 5th Edition]
C12P 7/42	9282-4B
C12N 1/20	A 7236-4B
//(C12P 7/42	
C12R 1:40)	C12R 1:40)
(C12N 1/20	(C12N 1/20
C12R 1:40)	C12R 1:40)
【審査請求】未請求	[Request for Examination] Examination not requested
【請求項の数】 5	[Number of Claims] 5
【全頁数】 6	[Number of Pages in Document] 6
(21) 【出願番号】特願平 4-145729	(21) [Application Number] Japan Patent Application Hei 4-145729
(22) 【出願日】平成 4 年 (1992) 6 月 5 日	(22) [Application Date] 1992 (1992) June 5 day
(71) 【出願人】	(71) [Applicant]
【識別番号】000001258	[Applicant Code] 000001258
【氏名又は名称】川崎製鉄株式会社	[Name] KAWASAKI STEEL CORPORATION (DB 69-053-8244)
【住所又は居所】兵庫県神戸市中央区北本町通 1 丁目 1 番 28 号	[Address] Hyogo Prefecture Kobe City Chuo-ku Kita Honmachi-dori 1-1-28
(72) 【発明者】	(72) [Inventor]
【氏名】石倉 正治	[Name] Ishikura Masaharu
【住所又は居所】千葉県千葉市中央区川崎町 1 番地 川崎製鉄株式会社技術研究本部内	[Address] Inside of Chiba Prefecture Chiba City Chuo-ku Kawasaki-cho 1 Kawasaki Steel Corporation (DB 69-053-8244) technology research headquarters
(72) 【発明者】	(72) [Inventor]
【氏名】上原 健一	[Name] Uehara, Kenichi

【住所又は居所】千葉県千葉市中央区川崎町1番地 川崎製鉄
株式会社技術研究本部内

[Address] Inside of Chiba Prefecture Chiba City Chuo-ku Kawasaki-cho 1 Kawasaki Steel Corporation (DB 69-053-8244) technology research headquarters

(72) 【発明者】

【氏名】武 内 大 造

【住所又は居所】千葉県千葉市中央区川崎町1番地 川崎製鉄
株式会社技術研究本部内

(72) [Inventor]

[Name] Takeuchi, Daizo

[Address] Inside of Chiba Prefecture Chiba City Chuo-ku Kawasaki-cho 1 Kawasaki Steel Corporation (DB 69-053-8244) technology research headquarters

(74) 【代理人】

【弁理士】

(57) 【要約】

【目的】従来は高温・高圧の反応で化学合成されていたパラヒドロキシ安息香酸を省エネルギー的に微生物による変換によってパラクレゾールから安価に製造する。

(74) [Attorney(s) Representing All Applicants]

[Patent Attorney]

(57) [Abstract]

[Objective] P-hydroxybenzoic acid which chemical synthesis is done until recently with reaction of the high temperature * high pressure from para cresol is produced in inexpensive with conversion with the microorganism in energy conserving.

【構成】微生物Pseudomonas putida (シードモナス・ブチダ) KS-0160株の菌体を用いて、パラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変換するパラヒドロキシ安息香酸の製造方法。例えば、前記菌体を増殖させた後、パラクレゾールを添加して培養を継続するか、または増殖の開始点でパラクレゾールを添加して培養するか、あるいは増殖後、菌体を回収した後に該菌体を用いて、パラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変換させるパラヒドロキシ安息香酸の製造方法。

[Constitution] Making use of cell mass of microorganism Pseudomonas putida (Pseudomonas putida) KS-0160 strain, manufacturing method of p-hydroxybenzoic acid which converts para cresol to p-hydroxybenzoic acid. manufacturing method of p-hydroxybenzoic acid where after multiplying, adding para cresol, the for example aforementioned cell mass, or, or culture it continues with starting point of multiplication para cresol adds after cultures after multiplying, the cell mass recovering, making use of said cell mass, para cresol to p-hydroxybenzoic acid converts.

【特許請求の範囲】

【請求項1】微生物Pseudomonas putida (シードモナス・ブチダ) KS-0160株を用いて、パラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変換することを特徴とするパラヒドロキシ安息香酸の製造方法。

[Claim(s)]

[Claim 1] Making use of microorganism Pseudomonas putida (Pseudomonas putida) KS - 0160 strain, manufacturing method of p-hydroxybenzoic acid which designates that the para cresol is converted to p-hydroxybenzoic acid as feature.

【請求項2】前記微生物を、パラクレゾールを添加した培地で培養する請求項1に記載のパラヒドロキシ安息香酸の製造方法。

[Claim 2] Aforementioned microorganism, manufacturing method of p-hydroxybenzoic acid which is stated in the Claim 1 which is cultured with culture medium which adds para cresol.

【請求項3】前記微生物を培養して増殖させた後、パラクレゾールを添加して培養を継続し、パラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変換する請求項1に記載のパラヒドロキシ安息香酸の製造方法。

[Claim 3] Culturing aforementioned microorganism, after multiplying, adding the para cresol, manufacturing method of p-hydroxybenzoic acid which is stated in Claim 1 which continues culture, converts para cresol to p-hydroxybenzoic acid.

【請求項4】前記微生物を培養して増殖させた後、菌体を回収

[Claim 4] Culturing aforementioned microorganism, after

して、該菌体を用いてパラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変換する請求項1に記載のパラヒドロキシ安息香酸の製造方法。

【請求項5】 *Pseudomonas putida* (シュードモナス・プチダ) KS-0160株であることを特徴とする微生物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、パラクレゾールを微生物を用いて変換しパラヒドロキシ安息香酸を製造する方法に関する。さらに詳しく述べると、本発明は、新規な微生物シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) KS-0160株菌株を培養し、培養液に通常、防腐剤として使用される化学品パラクレゾールを添加して、培養液中に変換生成され蓄積したパラヒドロキシ安息香酸を採取することからなる、パラヒドロキシ安息香酸の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来、パラヒドロキシ安息香酸の製造は、フェノールを原料とし、そのカリウム塩に二酸化炭素を高温・高圧下で作用させるコルベ・シュミット法による化学合成法が一般に行われてきた。しかし、反応条件として高温・高圧を要するためにエネルギー消費量が大きく、またアルカリ塩を多量に使用するなどの問題があった。

【0003】 一方、常温・常圧で進行する微生物によるパラヒドロキシ安息香酸の製造法は、エネルギー的に有利なことが期待される。しかし、これまでの微生物転換法はアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) (U B C 8 1 4) の菌体抽出酵素による安息香酸からの変換 (Reddy, C. C. & Vaidyanathan, C. S. : *Biochim. Biophys. Acta* 384, 46-57) や、パラキシレンを唯一の炭素源とするシュードモナス・エルギノーザ (*Pseudomonas aeruginosa*) のキシレン代謝経路でパラクレゾールやパラヒドロキシ安息香酸を検出している例 (大森など, *Agri. Biol. Chem. Vol 31, 1337(1967)*) が知られている程度で、しかもいづれの反応も安息香酸からの生成や代謝分解中間体としてパラヒドロキシ安息香酸を検出して、パラキシレンの分解がパラヒドロキシ安息香酸を経て進行することを明らかにしているに過ぎない。また、パラクレゾールを原料として与え、これを変換してパラヒドロキシ安息香酸を生成させて培地中に蓄積させて採取することは示唆されていない。

multiplying, cell massrecovering manufacturing method of p-hydroxybenzoic acid which it states in Claim 1 which converts para cresol to p-hydroxybenzoic acid making use of said cell mass.

[Claim 5] Microorganism which designates that it is a *Pseudomonas putida* (*Pseudomonas putida*) KS-0160 strain as feature.

【Description of the Invention】

[0001]

[Field of Industrial Application] This invention converts para cresol making use of microorganism and regards the method which produces p-hydroxybenzoic acid. Furthermore when you express in detail, this invention cultures novel microorganism *Pseudomonas putida* (*Pseudomonas putida*) KS-0160 strain, adding chemical product para cresol which is used for fermentation broth usually, as antiseptic, is converted by culture medium is formed and p-hydroxybenzoic acid which is accumulated consists of fact that it recovers, it regards manufacturing method of the p-hydroxybenzoic acid.

[0002]

[Prior Art] Until recently, production of p-hydroxybenzoic acid designated phenol as the starting material, in potassium salt chemically synthetic method due to Kolbe-Schmitt method which operates under the high temperature * high pressure was done carbon dioxide generally. But, there was a or other problem to which energy consumption is large in order to require the high temperature * high pressure, as reaction condition in addition uses alkali salt for large amount.

[0003] On one hand, as for production method of p-hydroxybenzoic acid due to microorganism which is advanced with ambient temperature * ambient pressure, energetically beneficial thing is expected. But, As for former microorganism conversion method conversion (Reddy, C.C. & Vaidyanathan, C.S.; *Biochimica et Biophysica Acta* (0005-2728, BBBMBS) 384, 46-57) from benzoic acid due to the microbe mass extraction enzyme of *Aspergillus niger* (*Aspergillus niger*) (U B C 8 1 4) and, With extent where example (*Agri. Biol. Chem. Vol 31, 1337(1967)*) such as (Omori) which detects para cresol and the p-hydroxybenzoic acid with xylene metabolism route of *Pseudomonas aeruginosa* (*Pseudomonas aeruginosa*) which designates paraxylene as the carbon source of only one is known, detecting p-hydroxybenzoic acid furthermore each reaction as formation and metabolism disassembly intermediate from benzoic acid, disassembly of paraxylene passing by p-hydroxybenzoic acid, it only makes fact that it

[0004]

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、常温・常圧で進行する経済的な微生物転換法を利用して、パラヒドロキシ安息香酸を製造する新規な方法を提供することである。

[0005]

【課題を解決するための手段】本発明者らは、化学的合成法よりも省エネルギー的な微生物の物質変換能に着目した。すなわち、微生物に増殖を支える基質を与えて増殖させ、この培養液にパラクレゾールを共存させて、これを酸化・変換させるコ・オキシデーション (Co-oxidation) の方法によってパラヒドロキシ安息香酸を生成させ、これを分解させることなく著量蓄積させる方法を完成することを目的とした。そこで、本発明者らはコ・オキシデーションによりパラクレゾールからパラヒドロキシ安息香酸を生成する能力を持つ微生物を各地の土壤から検索した結果、シュードモナス・プチダ種に属する細菌菌株に、パラクレゾールのみをパラヒドロキシ安息香酸に変換する菌株を見いだし、本発明を完成した。

【0006】すなわち、本発明は、微生物 *Pseudomonas putida* (シュードモナス・プチダ) KS-0160 株の菌体を用いて、パラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変換するパラヒドロキシ安息香酸の製造方法を提供する。さらに、前記微生物の菌体を、パラクレゾールを添加した培地で培養するパラヒドロキシ安息香酸の製造方法を提供する。また、前記微生物の菌体をパラクレゾールを添加した培地で増殖させた後、菌体を回収し、得られた菌体を用いてパラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変換するパラヒドロキシ安息香酸の製造方法を提供する。さらに、前記微生物の菌体を培養して増殖させた後、パラクレゾールを添加して培養を継続し、パラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変換するパラヒドロキシ安息香酸の製造方法を提供する。さらに、*Pseudomonas putida* (シュードモナス・プチダ) KS-0160 株を提供する。本発明の発明者らは、千葉県千葉市の土壤から下記の方法により目的とする微生物を分離した。

advances clear. In addition, giving para cresol converting this and forming p-hydroxybenzoic acid as the starting material, work quantity accumulating in culture medium, it is not suggested that it recovers.

[0004]

【Problems to be Solved by the Invention】 Objective of this invention making use of economic microorganism conversion method which is advanced with the ambient temperature * ambient pressure, is to offer novel method which produces p-hydroxybenzoic acid.

[0005]

【Means to Solve the Problems】 As for these inventors, you paid attention to substance conversion ability of energy conserving microorganism in comparison with chemical synthesis method. Giving substrate which supports multiplication in namely, microorganism, multiplying para cresol coexisting to this fermentation broth, forming p-hydroxybenzoic acid theoxidation * with method of co-oxidation (Co-oxidation) which it converts this, work quantity it designated that method which is accumulated is completed as object without disassembling this. Then, as for these inventors as for result of searching microorganism which has capacity which forms p-hydroxybenzoic acid from para cresol with co-oxidation from the soil of each area, in bacteria strain which belongs to *Pseudomonas putida* kind, the strain which converts only para cresol to p-hydroxybenzoic acid was discovered, the this invention was completed.

[0006] Namely, this invention offers manufacturing method of p-hydroxybenzoic acid which converts para cresol to the p-hydroxybenzoic acid making use of cell mass of microorganism *Pseudomonas putida* (*Pseudomonas putida*) KS - 0160 strain. Furthermore, cell mass of aforementioned microorganism, manufacturing method of the p-hydroxybenzoic acid which is cultured with culture medium which adds para cresol is offered. In addition, cell mass of aforementioned microorganism with culture medium which adds para cresol after multiplying cell mass it recovers, it offers manufacturing method of p-hydroxybenzoic acid which converts para cresol to p-hydroxybenzoic acid the making use of cell mass which is acquired. Furthermore, culturing cell mass of aforementioned microorganism, after multiplying adding para cresol, it continues culture, it offers the manufacturing method of p-hydroxybenzoic acid which converts para cresol to p-hydroxybenzoic acid. Furthermore, *Pseudomonas putida* (*Pseudomonas putida*) KS - 0160 strain is offered. Inventors of this invention separated microorganism which is made objective from soil of Chiba Prefecture Chiba City with below-mentioned method.

【0007】分離の方法は、千葉県千葉市の土壤から得られた根本土1gに滅菌水10mLを加えて懸濁し、得られた懸濁液を1白金耳取り、通常の細菌用培地を用いた寒天平板に接種し、28°Cで1日間静置培養し、得られたコロニーの内の1つを1白金耳取り、再び前記と同じ平板培地に移植した。この継代培養を数回繰り返して、本発明の目的とする微生物を得た。

[0007] Suspension it did method of separation, in preparation earth1g which is acquired from soil of Chiba Prefecture Chiba City including thesterile water 10 ml, 1 platinum loop it took suspension which is acquired, theinoculation it did in agar plate which uses culture medium for conventional bacteria, the1 day stationary culture did with 28 °C, 1 platinum loop it took one amongthe colony which are acquired, transplant did again in same flat plate culture medium asdescription above. This subculturing microorganism which several times over again, is made objective ofthe this invention was acquired.

【0008】(作用) 本発明において利用する上記菌株の菌学的性質は次の通りである。

シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) KS-0160株の菌学的性質

(a) 形態

1. 細胞の形と大きさ：桿菌、約0.7~1.0×2.0~3.0μm

2. 運動性の有無と鞭毛の着生状態：有り、極鞭毛(2本)

3. 細胞の多形性および胞子の有無：共になし

4. グラム染色性：陰性

(b) 各種培地における成育状態

1. 肉汁寒天平板培養：

(1) 不定形、灰白色

(2) 円形、なめらかなコロニー、淡黄褐色(植継続時)

2. 肉汁寒天斜面培養：成育良好、淡黄褐色、コロニーの外側に透明帯

3. 肉汁液体培養：成育良好

4. 肉汁ゼラチン穿刺培養：液化しない

5. リトマス・ミルク：リトマスを還元、アルカリ性化(微弱)

【0009】(c) 生理学的性質

1. 硝酸塩の還元：陰性

2. 亜硝酸塩の還元：陰性

[0008] (Action) Regarding to this invention, microbiological characteristic of above-mentioned strain whichit utilizes is as follows.

Microbiological characteristic of *Pseudomonas putida* (*Pseudomonas putida*) KS - 0160 strain

(A) Shape

Shape and size : bacillus and approximately 0.7 to 1.0 X 2.0 to 3.0 μm of 1. cell

There is a presence or absence of 2. mobility and a adhesion state : of flagella, polar flagellum(2)

Both polymorphism of 3. cell and presence or absence : of spore none

4. gram staining property : Negative

(B) In various culture medium, growth state

1. meat extract agar plate culture:

(1) Amorphous and ash white

(2) Round, smooth colony and light yellow-brown (Planting successive)

In outside of 2. meat extract agar slant culture : growth good, light yellow-brown and colony zona pellucida

3. meat extract liquid culture : Growth good

4. meat extract gelatin inoculated culture : liquefaction it does

To reduce 5. litmus milk : litmus, alkalinity conversio n(very weak)

[0009] (C) Physiological characteristic

1. nitrate reduction : Negative

Reduction: of 2. nitrite Negative

3. MR テスト : 隆性	3. MR test : Negative
4. VP テスト : 隆性	4. VP test : Negative
5. インドールの生成 : 隆性	Formation: negative of 5. indole
6. 硫化水素の生成 : 隆性 (TSI 培地)	Formation : of 6. hydrogen sulfide Negative (TSI culture medium)
7. 淀粉の加水分解 : 隆性	Hydrolysis : of 7. starch Negative
8. 脱窒反応 : 隆性	8. denitrification reaction : Negative
9. プロトカテキン酸の開裂 : 阳性	Cleavage : positive of 9. protocatechuic acid
10. アルギニンジヒドロラーゼ : 阳性	10. arginine dihydrolase : positive
11. 色素 : 生成せず (Difco 社製 Pseudomonas F Agar および Pseudomonas P Agar)	11. dye : It does not form, (Difco supplied Pseudomonas F Agar and Pseudomonas P Agar)
12. リパーゼ : ±	12. lipase : +/-
13. ウレアーゼ : 隆性	13. urease : Negative
14. カタラーゼ : 阳性	14. catalase : Positive
15. オキシダーゼ : 阳性	15. oxidase : Positive
16. 成育範囲	16. growth range
温度 : 10 ~ 40 °C	Temperature : 10 to 40 °C
PH : 5. 0 ~ 9. 5	PH : 5.0 to 9.5
17. グルコン酸の酸化 : 微陽性	Oxidation : weakly positive of 17. gluconic acid
18. アセトアミドの加水分解 : 隆性	Hydrolysis : negative of 18. acetamide
19. 酸素に対する態度 : 好気的	It confronts 19. oxygen attitude : aerobic
20. O-F テスト : 酸化的	20. O-F test : Oxidative
21. 糖類からの酸の生成 (Hugh-Leifson 法) :	Acid production (Hugh-Leifson method): from 21. saccharides
ス + L-アラビノース - D-キシロース	L- arabinose - D- xylose +
ス + D-グルコース + D-マンノース	D- glucose + D- mannose +
ース + D-フラクトース + D-ガラクトース	D- fructose + D- galactose +
- 麦芽糖 - ショ糖	Malt sugar - sucrose
ト - 乳糖 - D-マンニット	Lactose - D- mannitol -
- グリセリン + 淀粉	Glycerin + starch -

	トレハロース	-	イノシット	Trehalose	-	inositol
	22. ポリ- β -ヒドロキシ酪酸の蓄積	-		Accumulation: - of 22. poly β -hydroxy butanoic acid		
	23. 炭素化合物の資化性 (飯塚・駒形法)			Assimilation (Iizuka-Komagata method) of 23. carbon compound		
ス	-	L-アラビノース	-	D-キシロース	L- arabinose	-
ス	+	D-グルコース	+	D-マンノース	D- glucose	+
ース	-	D-フラクトース	+	D-ガラクトース	D- fructose	+
-	麦芽糖	-	ショ糖	Malt sugar	-	sucrose
ト	-	乳糖	-	D-マンニット	Lactose	-
-	グリセリン	+	澱粉	Glycerin	+	starch
-	トレハロース	-	ソルビトール	Trehalose	-	sorbitol
ス	-	イノシット	-	D-ソルボース	Inositol	-
リ	トール	-	セロビオース	meso-エリス	Cellobiose	-
+	酢酸	+	安息香酸	Acetic acid	+	benzoic acid
+	フェニル酢酸	-	プロピオン酸	Phenylacetic acid	-	propanoic acid
+	酒石酸	+	クエン酸	Tartaric acid	+	citric acid
+	マロン酸	+	L-リンゴ酸	Malonic acid	+	L- malic acid
+	ベタイン	+	フマル酸	Betaine	+	fumaric acid
+	ニコチン酸	-	β -アラニン	Nicotinic acid	-	β -alanine
ン	+	L-アラニン	+	L-オルニチン	L- alanine	+
アラニン	+	L-アルギニン	+	L-フェニル	L-arginine	+
	グリシン	+	L-トリプト	Glycine	+	L- tryptophan

ファン -

+	L-シトルリン	-	エタノール	L-citrulline	-	ethanol	+
ール +	1-プロパノール	+	2-プロパン	1 - propanol	+2 - propanol	+	
-	1-ブタノール	+	サリシン	1 - butanol	+	salicin	-
	α -ケトグルタル酸	+		α -keto glutaric acid	+		

【0010】本発明者らは、パラクレゾールに対して、微生物学的コ・オキシデーション作用を示す上記細菌菌株について、その菌学的性質に基づき、バージース・マニュアル・オブ・システムマチック・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology), Vol. 1, 140 ~ 220 (1984) に記載の基準に従って公知の菌株との異同を検討した。その結果、シュードモナス・ブチダ種に属する新規な菌株と認め、シュードモナス・ブチダ (Pseudomonas putida) KS-0160株と命名した。

【0011】この菌株は、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に、平成4年3月17日付けで、Pseudomonas putida KS-0160という識別のための表示で寄託・保管されており、その寄託番号は微工研菌寄第12879号 (FERM P-12879) である。本発明で使用する細菌菌株は、シュードモナス・ブチダKS-0160株と同定される菌株であって、パラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変換する能力のある菌株であればよい。したがって、土壤から単離した菌株で、バージース・マニュアル・オブ・システムマチック・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology), Vol. 1, 140 ~ 220 (1984) に記載の基準により、シュードモナス・ブチダKS-0160株の菌株であると同定した菌株であってもよい。また微工研などの機関から入手したものであってもよい。

【0012】本発明者は、この細菌菌株が、上述したように、コ・オキシデーション作用によりパラクレゾールを変換して、パラヒドロキシ安息香酸を生成することができることを知見し本発明に至った。

【0013】本発明の製造方法は、シュードモナス・ブチダKS-0160株の菌体のコ・オキシデーション作用を利用することにより、微生物の培養液中に出発物質を共存させ、微生物の増殖は、変換させたい出発物質とは別の増殖に必要な炭素源、窒素源で行い、増殖した微生物が培養液中に共存させた出発物質を酸化変換させること、あるいは増殖した微生物を分離・回収した後、微生物菌体を懸濁した反応液を調整して、変換反応に必要なエネルギー源、例えばグルコース、グリセリンなどを供給しながら、微生物の酸化能を利用して出発物質を酸化変

[0010] These inventors following to reference which is stated in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology), Vol. 1, 140 to 220(1984) concerning above-mentioned bacteria strain which shows microbiological co-oxidation action vis-a-vis para cresol, on basis of microbiological characteristic, examined the dissimilarity of strain of public knowledge. As a result, novel strain and signet and Pseudomonas putida (Pseudomonas putida) KS-0160 strain which belong to Pseudomonas putida kind it designated.

[0011] This strain, in Ministry of International Trade and Industry National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, with 1992 March 17 date, deposit * is kept in indication for identifying, Pseudomonas putida KS-0160, deposit number is NIBH microbe deposition number 12879 number (FERM P-12879). As for bacteria strain which is used with this invention, Pseudomonas putida KS-0160 strain and being a strain which identification is done, as for that it is good with strain which has capacity which converts para cresol to p-hydroxybenzoic acid. Therefore, with strain which is isolated from soil, when it is a strain of Pseudomonas putida KS-0160 strain, with reference which is stated in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology), Vol. 1, 140 to 220(1984), it is possible to be a strain which identification is done. In addition it is possible to be something which is procured from the NIBH or other organization.

[0012] This bacteria strain, above-mentioned way, co-oxidizing para cresol with co-oxidation action, being able to form p-hydroxybenzoic acid knowledge it did this inventor and reached to this invention.

[0013] As for manufacturing method of this invention, In utilizing co-oxidation action of cell mass of Pseudomonas putida KS-0160 strain to depend, starting substance coexisting to culture medium of microorganism. As for multiplication of microorganism, Necessity for another multiplication from starting substance which you want to convert is carbon source, While doing with nitrogen source, oxidation converting starting substance where the microorganism

換させることである。本発明では、微生物シードモナス属を用いて工業的規模でパラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に酸化することができる。特に、シードモナス・プチダKS-0160株を用いて、パラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に酸化することである。

【0014】本発明の製造方法は、微生物を増殖させる工程および微生物を利用してパラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変換する工程を包含する。また、微生物を増殖させる工程（増殖工程）と微生物を利用してパラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変換する工程（変換工程）は、別々の工程であっても、同時に行われる工程であってもよい。

【0015】本発明の方法で使用する細菌菌株を増殖する（増殖工程）ための培地としては、通常の細菌用培地を使用してもよいが、この菌株が良好に成育できる培地で、かつ微生物変換反応を進行させるものであれば、いかなる組成の培地も使用できる。この時に用いる培地は、培地成分として、適当な炭素源、窒素源および無機塩などを含有しうる。また、本発明の変換工程に使用する培地は、菌体増殖用と同様の培地を用いてもよく、また異なる培地を用いてもよい。また、菌体を増殖させた後、菌体の置換作用を維持できる溶液、例えば、生理食塩水のような溶液を培地の代わりに用いてもよい。培地成分に、前記菌体を増殖するための培地に含まれる成分と同じ成分を含み得る。

【0016】炭素源としては、本発明の菌株が利用できる任意の炭素源を使用できる。かかる炭素源として利用できる有機物には、上記の菌学的性質において示したように、グリセリンなどの有機化合物、グルコース、フラクトースなどの炭水化物、オリーブ油、大豆油などの脂質、エタノールなどのアルコール、コーンスティープリカ、廃糖蜜などの農産物抽出・精製残渣あるいはマロン酸、クエン酸などの有機酸が例示できる。菌体増殖用の培地の場合には、上述したような本発明の菌株が利用し得る1種または2種以上の炭素化合物を任意に炭素源として利用できる。また、変換培養用の培地の場合には、増殖用に使用した全ての炭素源が利用できるが、グルコース、グリセリ

which multiplied coexists to culture medium, or separation and recovery after doing the microorganism which multiplied, adjusting reaction mixture which microbial cell mass the suspension is done, supplying energy source, for example glucose and glycerin etc which are necessary for conversion reaction, it is oxidation to convert the starting substance making use of oxidation ability of microorganism. With this invention, with industrial scale oxidation is possible para cresol to the p-hydroxybenzoic acid making use of microorganism *Pseudomonas* sp.. Especially, para cresol it is oxidation to do in p-hydroxybenzoic acid making use of the *Pseudomonas putida* KS - 0160 strain.

[0014] Manufacturing method of this invention includes step which converts para cresol to the p-hydroxybenzoic acid microorganism making use of step and microorganism which multiply. In addition, microorganism step (exchange step) which converts para cresol to p-hydroxybenzoic acid making use of step (amplification step) and microorganism which multiply also being a separate step it may be a step which is done simultaneously.

[0015] It is possible to use culture medium for conventional bacteria, bacteria strain which is used with method of this invention as culture medium because of (amplification step) it multiplies, but this strain if with culture medium which growth it is possible in good, it is something which at same time advances microbiotic conversion reaction, you can use culture medium of every composition. culture medium which is used this time, can contain suitable carbon source, nitrogen source and inorganic salt etc as culture medium component. In addition, culture medium which is used for exchange step of this invention making use of culture medium which is similar to one for cell mass proliferation is good, making use of culture medium which in addition differs is good. In addition, cell mass after multiplying, it is possible to use the solution like solution and for example physiological saline which can maintain substitution action of cell mass in place of culture medium. Aforementioned cell mass it can include same component as component which is included in culture medium in order to multiply in culture medium component.

[0016] As carbon source, optional carbon source which can utilize strain of this invention can be used. As shown in above-mentioned microbiological characteristic, glycerin or other organic compound, glucose, the fructose or other carbohydrate, olive oil, soybean oil or other lipid, ethanol or other alcohol, corn steep liquor and blackstrap molasses or other agricultural product extraction * purified residue or it can illustrate to organic substance which it can utilize as this carbon source, malonic acid and citric acid or other organic acid. In case of culture medium for cell

ンなど本菌の利用しやすい有機化合物や単糖類が好ましい。炭素源の含有量は、炭素源の種類によっても異なるが、培地中2重量%以上であるのが好ましい。

mass proliferation, optionally it can utilize the carbon compound of one, two or more kinds which strain of this invention a above-mentioned way can utilize as carbon source. In addition, in case of culture medium for conversion culture, it can utilize all carbon source which is used for one for multiplication, but, the organic compound and sugar source which such as glucose this strain is easy to utilize and glycerin are desirable. content of carbon source differs, with types of carbon source, but it is desirable to be a 2 wt% or more in culture medium.

【0017】窒素源としては、特に限定されないが、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウムなどの無機窒素化合物、およびペプトン、酵母エキス、カザミノ酸などの有機窒素源が利用できる。有機窒素化合物を用いた場合、これには炭素も含まれているので、別の炭素源を新たに加えることは増殖用培地の場合には必ずしも必要でない。

[0017] As nitrogen source, especially it is not limited, but it can utilize the ammonium sulfate, ammonium nitrate or other inorganic nitrogen compound, and peptone, yeast extract and casamino acid or other organic nitrogen source. When organic nitrogen compound is used, because also carbon is included in this, to add another carbon source anew, it is not necessary always in case of the growth medium.

【0018】無機塩類としては、各種の硫酸塩、リン酸塩、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩などが使用できる。さらに、微量の重金属類（例えば、鉄塩、マンガン塩、銅塩、亜鉛塩、モリブデン塩、コバルト塩など）を培地に含有させててもよい。

[0018] As inorganic salts, various sulfate, you can use phosphate, the sodium salt, potassium salt, magnesium salt and calcium salt etc. Furthermore, it is possible to culture medium to contain heavy metal (Such as for example iron salt, manganese salt, copper salt, zinc salt, molybdenum salt and cobalt salt) of the trace amount.

【0019】培養方法としては、振盪培養法、深部通気攪拌培養法などの方法により行うことができる。培養温度は、20～37℃、pHは中性付近、攪拌は80～400 rpm、培養日数は反応の進行に応じて決めることができるが、通常は菌体増殖に1～2日、パラクレゾールをパラヒドロキシ安息香酸に変換するのには、約1～2日が適当である。2日を超えると、菌体の増殖工程では副生物を生じることや若干の変換物質の分解を生じるので好ましくない。さらに、菌体の増殖とパラクレゾールの変換の工程は合計で2～3日程度であるのが適当である。この時に変換の原料となるパラクレゾールは水に難溶性であるために、ポリオキシエチレンソルビタンなどの各種の界面活性剤を培地に添加することも可能である。また、必要に応じて、脂肪酸エステル系、シリコン系などの消泡剤を添加してもよい。

[0019] As culture method, it is possible to do with shaker culture and deep part aerated stirred culture or other method. As for culture temperature, as for 20 to 37℃ and pH as for neutral vicinity and churning as for 80 to 400 rpm and culture days it is possible to decide according to advance of reaction, but usually in order 1 to 2 day, to convert para cresol to p-hydroxybenzoic acid in cell mass proliferation, approximately 1 to 2 day is suitable. When it exceeds 2 day, because with amplification step of cell mass disassembly of thing and somewhat conversion substance which cause the by-product is caused, it is not desirable. Furthermore, as for step of conversion of multiplication and the para cresol of cell mass it is suitable to be a 2 to 3 days extent with total. para cresol which becomes starting material of conversion this time because it is a poorly soluble in water, adding polyoxyethylene sorbitan or other various surfactant to culture medium is possible. In addition, according to need and fatty acid ester system, it is possible to add the silicon type or other foam inhibitor.

【0020】本発明の製造方法に用いるパラクレゾールは、菌体の増殖培養開始時に添加してもよく、また、菌体の増殖培養後添加してもよい。さらに、増殖培養時および増殖培養後の両方に添加してもよい。

[0020] It is possible to add para cresol which is used for manufacturing method of the this invention, at time of multiplication start of culture of cell mass, in addition, multiplication culture postaddition of cell mass to do it is possible. Furthermore, at time of multiplication culture and it is possible to add to both after multiplication culturing.

【0021】また、菌体の増殖培養後添加する場合、パラクレゾールを添加する時期は、菌体濃度が、660 nmの吸光度で、1.0～10.0の時に添加するのが好ましい。パラクレゾールの添加方法としては、一度にあるいは少量づつ添加してもよいし、その添加の時期は、菌体増殖の開始点で加えてもよく、また、経時に添加する場合、増殖後1日目、2日目に等量に分割して添加してもよい。さらに、パラクレゾールが0.1～0.2重量%となるように連続的に添加してもよい。添加するパラクレゾールの培養液中の濃度は、3重量%以下、特に1重量%以下であるのが好ましく、さらに0.2～0.5重量%であるのが好ましい。3重量%超では、微生物が十分に作用しなくなるので好ましくない。パラクレゾールを添加する時期を、菌体の増殖前にすると増殖後にするとでは、菌体の増殖後に添加した方が5～10%変換率が高い。

[0021] In addition, when multiplication culture postaddition of cell mass it does, as for time which adds para cresol, when cell concentration, with theabsorbance of 660 nm, being a 1.0 to 10.0, it is desirable to add. As addition method of para cresol, or at a time trace it is possible atone time to add and, it is possible to add time of addition,with starting point of cell mass proliferation, in addition, when it adds to timewise, after multiplying dividing into equivalent in 1st day, and 2nd dayto add it is possible. Furthermore, in order for para cresol to become 0.1 to 0.2 wt%, it ispossible to add to continuous. As for concentration of culture medium of para cresol which it adds, it isdesirable to be a 3 wt% or less and a especially 1 wt% or less, furthermore it isdesirable to be a 0.2 to 0.5 weight%. Because 3 wt% super with, microorganism stops operating fully, it isnot desirable. That time which adds para cresol, is designated as beforemultiplying of cell mass it makes after multiplying that with, one which adds after multiplying of cell mass 5 to 10 % conversion ratio is high.

【0022】さらに、増殖工程および変換工程を、パラクレゾールを添加する時期の組み合わせで考えると、以下の組み合わせが例示される。

[0022] Furthermore, when of amplification step and exchange step, are thought withcombination of time which adds para cresol, combination below the is illustrated.

1) パラクレゾールを、増殖工程の開始点で加え、増殖工程と変換工程を同時に使う。

1) para cresol, is added with starting point of amplification step, amplification step and exchange step are done simultaneously.

2) 微生物を増殖させた後パラクレゾールを加えて、変換工程を行う。パラクレゾールの添加は、変換工程の途中、または開始点と途中の両方で添加する。

2) microorganism after multiplying including para cresol, exchange step is done. Addition of para cresol, adds with both in middle, or starting point and middle of exchange step.

3) パラクレゾールの添加を増殖工程と変換工程とに各々少なくとも1回以上行い、増殖工程の後に菌体を培地から分離して変換工程の培地に移植する。

3) it adds para cresol in amplification step and exchange step each theone time or more, separates cell mass from culture medium at least after amplification step and the transplant does in culture medium of exchange step.

上述の変換工程の培地は、増殖工程に用いた培地と同様の培地であってもよく、また、本発明の菌体が有する変換作用を妨げない溶液、例えば、生理食塩水のような溶液であってもよい。また、前記2)の方法では、菌体を増殖後、パラクレゾールを添加して培養を継続することが含まれる。

Culture medium of above-mentioned exchange step may be culture medium which is similar to culture medium which is used for amplification step, in addition, to be the solution like solution and for example physiological saline which do not obstruct the conversion action which cell mass of this invention has is possible. In addition, aforementioned 2) with method, after multiplying adding para cresol, continuing culture is included the cell mass.

【0023】変換反応終了後、生成したパラヒドロキシ安息香酸の培養液からの分離・精製は、一般の有機化合物の分離・精製と同様に、溶媒抽出、カラムクロマトグラフィー、中和、濃縮、結晶化などの当業者に周知の手段を適宜組み合わせることにより行うことができる。たとえば、培養液から固体を遠心分離によって除いた後、上清を濃縮し、次いで酸化してパラヒドロキシ安息香酸を沈殿させて固液分離する方法、あるいは上記

[0023] After conversion reaction ending, in same way a s separation and purification of general organic compound,to do by as needed combining widely known means in solvent extraction, the column chromatography, neutralization, concentration and crystallization or other person skilled in the art it is possible theseparation and purification from

上清を酸性化した後、酢酸エチル、クロロホルムなどの有機溶媒による溶媒抽出で生成物を分離する方法がある。また、パラヒドロキシ安息香酸が生成沈澱している場合は、溶媒抽出による回収が有効な方法である。得られた粗製物を各種のカラムクロマトグラフィーあるいは再結晶などの方法によって精製することができる。

fermentation broth of p-hydroxybenzoic acid which is formed. After excluding solid from for example fermentation broth due to centrifugal separation, toconcentrate supernatant, acidification doing next and precipitating the p-hydroxybenzoic acid solid-liquid separation method of doing. Or acidification after doing above-mentioned supernatant, there is a method which separates product with solvent extraction due to ethyl acetate and the chloroform or other organic solvent. In addition, when p-hydroxybenzoic acid having formed and precipitating, there recovery with solvent extraction is effective method. crude product which is acquired can be refined with various column chromatography or recrystallization or other method.

【0024】本発明の方法により製造されるパラヒドロキシ安息香酸は、防腐剤として使用される他、医薬品、農薬、染料、液晶などの原料として有用である。

[0024] P-hydroxybenzoic acid which is produced by method of this invention is useful as the antiseptic besides it is used, as drug, pesticide, dye and the liquid crystal or other starting material.

【0025】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

【0026】(実施例1) 本実施例は、本発明の方法によるパラクレゾールからパラヒドロキシ安息香酸への微生物による変換を例示する。使用した培地は下記組成のものであった。

培地組成	
リン酸2ナトリウム	3. 0 g
リン酸1カリウム	2. 0 g
尿素	2. 0 g
硫酸マグネシウム・7水塩	0. 2 g
炭酸ナトリウム	0. 1 g
塩化カルシウム・2水塩	0. 01 g
硫酸鉄・7水塩	0. 005 g
グリセリン	2. 0 g
酵母エキス	1. 0 g
イオン交換水	1. 0 L

PH 6. 8

(PH調整後、120°C、1.2 kg/cm²、20分間滅菌して使用)

(After pH adjustment, 120 °C, 1.2 kg/cm² and 20 min in sterilization doing, use)

【0027】上記培地100mLにシュードモナス・プチダ (Pseudomonas putida) KS-0160株の菌株1白金耳を接種し、30°Cで1夜振盪培養した。得られた培養液の10mLを、同様の培地100mLを仕込んだ300mL容フラスコに接種して1日間振盪培養を行った。培養条件は、温度30°C、pH 6.8、180 rpmであった。培養開始1日後および2日後にパラクレゾールを各々0.1gづつ添加して合計3日間の培養を行った。培養終了後、遠心分離によって菌体を除き、減

[0027] Inoculation it did strain 1 platinum loop of Pseudomonas putida (Pseudomonas putida) KS-0160 strain in above-mentioned culture medium 100 ml, the 1 night shaking culture did with 30 °C. inoculation doing 10 ml of fermentation broth which is acquired, in the 300-ml capacity flask which inserted similar culture medium 100 ml, it did 1 day shaking culture. culture conditions, was temperature 30 °C, pH 6.8

圧下で20mLに濃縮し、20mLの酢酸エチルで3回抽出を行った。酢酸エチル層を合わせて蒸発乾固し、粗結晶を得た。粗結晶をエタノール：キシレンの1：1混合溶媒により再結晶させて、0.23g (88.5%) の精製物を得た。得られた物質は、元素分析およびNMR測定によって、バラヒドロキシ安息香酸と確認された。

and 180 rpm. At a time each 0.1 g adding para cresol after start of culture 1 day, and after 2 day it cultured total 3-day period. After culture ending, under vacuum it concentrated in 20 mL excluding cell mass due to centrifugal separation, did 3 time extraction with the ethylacetate of 20 mL. ethyl acetate layer was done evaporating and drying to solid together, crude crystal was acquired. recrystallization doing crude crystal with 1:1 mixed solvent of ethanol : xylene, it acquired the purified material of 0.23g(88.5%). substance which is acquired p-hydroxybenzoic acid was verified by the elemental analysis and nmr measurement.

元素分析値 (C 7, H 6, O 3)

計算値 : C 60.87%, H 4.38%

実測値 : C 60.87%, H 4.38%

^{13}C -NMR (δ ppm, DMSO-d₆ 中のTMS)

カルボニルC : 169.1

フェニレンC : 115.4, 121.3, 132.1, 161.8

【0028】(実施例2) 実施例1で使用したものと同様の組成の培地に対して0.2重量%のパラクレゾールを添加した培地100mLで実施例1と同様にシードモナス・ブチダKS-0160株を1白金耳接種して培養した前培養液10mLを、同様にパラクレゾール0.2重量%を添加した培地100mLを仕込んだ300mL容フラスコに接種して2日間、実施例1と同じ培養条件で培養を行った。2日後の培養液中のバラヒドロキシ安息香酸の生成量は0.22g (84.6%) であった。培養液からのバラヒドロキシ安息香酸の分離・精製は遠心分離によって菌体を除き、上清に硫酸を加えpHを1とした後、この酸性溶液よりクロロホルムでバラヒドロキシ安息香酸を抽出分離し、抽出液を減圧濃縮することによって粗結晶を得た。この粗結晶を実施例1と同様にエタノール：キシレンの1：1混合溶媒により再結晶することによって白色針状結晶0.20g (76.9%)を得た。

Elemental analysis values (C7,H6,O3)

Calculated value : C 60.87% and H 4.38%

Actual measured value : C 60.87% and H 4.38%

^{13}C -nmr (TMS in δ ppm and DMSO-d₆)

Carbonyl C: 169.1

Phenylene C: 115.4, 121.3 and 132.1, 161.8

[0028] (Working Example 2) 1 platinum loop inoculation doing Pseudomonas putida KS - 0160 strain in same way as Working Example 1 with culture medium 100 mL which adds para cresol of 0.2 wt% vis-a-vis culture medium of composition which is similar to those which are used with Working Example 1 inoculation doing preculture broth 10 mL which it cultured, in 300-mL capacity flask which inserted the culture medium 100 mL which adds para cresol 0.2 wt% in same way it cultured with same culture conditions as 2 day and Working Example 1 produced amount of p-hydroxybenzoic acid of culture medium after 2 day was 0.22g(84.6%). In supernatant after designating pH as 1 including the sulfuric acid, from this acidic solution p-hydroxybenzoic acid extractive separation it did separation and purification of the p-hydroxybenzoic acid from fermentation broth with chloroform excluding cell mass due to the centrifugal separation, it acquired crude crystal by vacuum concentration doing extracted liquid. This crude crystal in same way as Working Example 1 white needle crystal 0.20g(76.9%) was acquired doing with 1:1 mixed solvent of ethanol : xylene by recrystallization.

[0029] (Working Example 3) You used 300-mL capacity erlenmeyer flask 6 which inserted culture medium 100 mL of composition which is similar to those which are used with Working Example 1 1 platinum loop inoculation did Pseudomonas putida KS - 0160 strain in each flask, shaking culture did with 30 °C and 180 rpm. It added to jar * fermentor of 10 liter

【0029】(実施例3) 実施例1で使用したものと同様の組成の培地100mLを仕込んだ300mL容三角フラスコ6本を使用し、シードモナス・ブチダKS-0160株を各々のフラスコに1白金耳接種し、30°C、180 rpmで振盪培養した。得られた培養液600mLを、母菌として前記と同様の培地7Lを仕込んだ10L容のジャー・ファーメンターに添加し、同時に基質としてパラクレゾール15gを添加して培養を

行つた。1日後にさらに、パラクレゾール12gを添加して培養を継続し、合計2日間の培養を行つた。培養条件は、温度30°C、pH7.0、攪拌300rpm、通気量0.5容積/容量/分であった。培養終了後、10,000×Gで20分間の遠心分離によって菌体を除き、硫酸によりpH1とした後、実施例2と同様に処理してパラヒドロキシ安息香酸33.0g(95.7%)を得た。

【0030】(実施例4) 実施例1で使用したものと同様の組成の培地に対して0.2重量%のパラクレゾールを添加した培地3.5Lで、5L容ジャー・ファーメンターを用いて実施例3と同様の培養条件で2日間培養を行つた。2日後に菌体を10,000×Gで、20分の遠心分離によって集菌した。菌体収量は、105°C、2時間乾燥で4.2g/Lであった。集菌した生菌体全量をグリセリン0.1%を含有する0.2%の生理食塩水500mLに懸濁し、これにパラクレゾール1.5gを添加して30°Cで弱く攪拌しながら1時間反応させた。反応終了後、実施例3と同様の方法によりパラヒドロキシ安息香酸を抽出し、精製して再結晶によりパラヒドロキシ安息香酸1.8gを得た。収率は93.8%であった。

【0031】

【発明の効果】本発明の方法により、従来は高温・高圧の反応で化学合成されていた防腐剤、医薬品、農薬、染料、液晶などの原料として有用なパラヒドロキシ安息香酸をエネルギーをほとんど要せずに微生物酸化によってパラクレゾールから安価に製造することができた。

capacity which inserted culture medium 7L which is similar to description above with fermentation broth 600 ml which is acquired, as mother microbe simultaneously it added para cresol 15g as the substrate and cultured. Furthermore, adding para cresol 12g after 1 day, it continued culture, cultured total 2 day. culture conditions, temperature 30 °C, pH 7.0 and churning 300 rpm, was amount of aeration 0.5 volume / volume per minute. After culture ending, with centrifugal separation of 20 min after making the pH 1 excluding cell mass, with sulfuric acid, treating in same way as the Working Example 2 with 10,000 X G, it acquired p-hydroxybenzoic acid 33.0g(95.7%).

[0030] (Working Example 4) With culture medium 3.5 L which adds para cresol of 0.2 wt% vis-a-vis culture medium of composition which is similar to those which are used with Working Example 1, it cultured 2 day with culture conditions which is similar to Working Example 3 making use of 5 liter capacity jar * fermentor. cell mass with 10,000 X G, microbe collection was done after 2 day with the centrifugal separation of 20 min. cell mass yield, was 4.2 g/l with 105 °C and 2 hours drying. While suspension doing live cells total amount which microbe collection is done in the physiological saline 500 ml of 0.2 % which contains glycerin 0.1 % adding para cresol 1.5g to this and agitating weakly with 30 °C 1 hour it reacted. It extracted p-hydroxybenzoic acid after reaction termination, with method which is similar to Working Example 3, refined and it acquired p-hydroxybenzoic acid 1.8g with therecrystallization. yield was 93.8 %.

【0031】

[Effects of the Invention] With method of this invention, until recently as antiseptic, drug, the pesticide, dye and liquid crystal or other starting material which chemical synthesis are done with reaction of high temperature * high pressure for most part without requiring energy, from para cresol to produce useful p-hydroxybenzoic acid in inexpensive with microorganism oxidation, it was possible.